

⑯ 日本国特許庁(JP)

⑰ 特許出願公開

⑱ 公開特許公報(A)

昭63-283578

⑤ Int. Cl.⁴
C 12 N 7/00
// C 12 N 15/00

識別記号 庁内整理番号
8717-4B
A-8412-4B

④ 公開 昭和63年(1988)11月21日

審査請求 未請求 発明の数 1 (全10頁)

⑥ 発明の名称 組み換えワクチニアウイルス

② 特 願 昭62-119967

③ 出 願 昭62(1987)5月16日

⑦ 発 明 者 波 田 博 東京都調布市国領町4-29-14

⑧ 出 願 人 波 田 博 東京都調布市国領町4-29-14

⑨ 代 理 人 弁理士 浅 村 皓 外2名

明 細 書

1. 発明の名称

組み換えワクチニアウイルス

2. 特許請求の範囲

(1) ワクチニアウイルスの増殖に非必須なゲノム領域に牛バラインフルエンザⅢ型由来のヘマグルチニン・ノイラミニダーゼをコードする cDNA の全部又は一部を組み込んだ組み換えワクチニアウイルス。

(2) 該 cDNA がプロモーターの支配下にある特許請求の範囲第1項記載の組み換えワクチニアウイルス。

(3) 該 cDNA が第5図のアミノ酸配列又はそれと実質的に同一機能を有するポリペプチドをコードするものである特許請求の範囲第1項又は第2項記載の組み換えワクチニアウイルス。

(4) 該 cDNA が第5図の塩基配列またはそれと実質的に同一の機能を持つ塩基配列を有するものである特許請求の範囲第1項又は第2項記載の組み換えワクチニアウイルス。

3. 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明は組み換えワクチニアウイルスに関し、さらに詳しくは、ワクチニアウイルスの増殖に非必須なゲノムDNA領域に牛バラインフルエンザⅢ型ウイルス由来の cDNA が組み込まれた組み換えワクチニアウイルス及び同 cDNA に関する。(従来の技術)

近年、ワクチニアウイルスに外来性DNAを組み込んだ組み換えワクチニアウイルスの構築法が考案され、外来性DNAとして、例えば感染症ウイルスの抗原コードDNAを用いた組み換えワクチニアウイルスを生ワクチンとして利用する方法が提案されるようになった(例えば特開昭58-129971号、特公表昭60-500518号、特公表昭61-501957号など)。

しかしながら、過去、牛バラインフルエンザⅢ型ウイルスの抗原コード遺伝子をワクチニアウイルスに組み込んだ例はなく、また、牛バラインフルエンザⅢ型ウイルスそのものの遺伝子解析につ

いてもほとんど情報がなく、ワクチニアウイルスに外来性DNAとして牛バラインフルエンザⅢ型ウイルス由来の抗原コードcDNAを組み込むことはほとんど不可能な状態にあった。

(発明が解決しようとする問題点)

そこで本発明者らは、かかる従来技術の下で牛バラインフルエンザⅢ型ウイルス由来の抗原コードcDNAがゲノムDNA中に組み込まれた増殖可能な組み換えワクチニアウイルスの構築を目指し鋭意検討を進めた結果、牛バラインフルエンザⅢ型ウイルスのcDNAよりヘマグルチニン・ノイラミニダーゼ(以下場合によりHNと称す)をコードする領域を選択しワクチニアウイルスのプロモーターに連結しワクチニアウイルスの増殖に非必須なゲノム領域に組み込めば増殖可能な組み換えワクチニアウイルスが得られることを見出し本発明を完成するに至った。

(問題点を解決するための手段)

かくして本発明によれば、牛バラインフルエンザⅢ型ウイルス由来の抗原をコードするcDNA

及び同cDNAをワクチニアウイルスの増殖に非必須なゲノム領域に、好ましくはプロモーター機能を有するDNAと共に、発現可能な形で組み込まれた組み換えワクチニアウイルスが提供される。

本発明において組み換えウイルスの作製に供されるウイルスはワクチニアウイルスに分類されるウイルスであればいかなるものでもよく、例えばWR株(ジャーナル オブ ヴィロロジー 49, 857, (1984)、リスター株、リスター株の温度感受性変異株(USP 4, 567, 147) New York Board of Health株、LC16 #8株などの種痘ワクチン株(ワクチン抗原用ベクターとしてのワクチニアウイルス "Vaccinia viruses as vectors for Vaccine Antigens" pp. 87-100, ジェイ・キンナン(J. Quinnan,) 編アムステルダム、ニューヨークおよびオックスフォード:エルセバ社) (Elsevier) 版)などが例示される。

また牛バラインフルエンザⅢ型ウイルス(以下BPIV3という)由来のヘマグルチニン・ノイ

ラミニダーゼをコードするcDNAは、例えば上記BPIV3のM株(インフエクシオン・アンド・イミユニティ Infection and Immunity 3, 4, 262~267, 1981)や910N株(マイクロバイオロジー・アンド・イミュノロジー Microbiology and Immunology 23, 617~618, 1979)を用いて調製することができる。

例えば上記M株から調製されたcDNAは第5図に示すとき配列を有する全部で1716塩基対から構成されており、また910N株から調製されるcDNAは1716塩基対中37番目、39番目、50番目、95番目、359番目、537番目、577番目及び1325番目の計8つが他の塩基に置換された構造を有している(第6図参照)。このようにBPIV3由来のHN遺伝子をコードするcDNAの配列は必ずしも一樣ではないが、本発明においては、上記二種類の

cDNAと実質的に同一の機能を有する範囲において、修飾されたcDNA(即ち、塩基配列が置

換、挿入、欠失したもの)であつてもよい。もちろん、実質的に同一の機能を有するかぎり、アミノ酸配列が異なる程度に修飾されたものであつてもよい。

本発明を実施するに当たっては、まずワクチニアウイルスの増殖に非必須なDNA領域を組み込んだ第一の組み換えベクターが作製される。同領域内にワクチニアウイルス内で機能するプロモーターが含まれているものが好ましい。ここで言う増殖に非必須なDNA領域とは、例えばワクチニアウイルスのチミジンキナーゼ(TK)遺伝子、血球凝集素(HA)遺伝子、ワクチニアウイルスWR株DNAのHindⅢ切断Fフラグメント、Mフラグメント、Nフラグメント(ウイルス 36 (1), 23-33, (1986))など、外来性DNAの挿入による変異を受けても実質上ウイルスの増殖に影響を及ぼさない領域を言う。

また、ワクチニアウイルス内で機能するプロモーターとは、合成・天然を問わずワクチニアウイルスが保有する転写の系でプロモーターとして有

効に機能しえるものならいかなる塩基配列のものでも良く、その具体例としては例えばジャーナルオブ ヴィロロジー 662-669 (1984) に示されるようなワクチニアウイルスのプロモーター-具体的には7.5Kポリペプチドをコードするワクチニアウイルス遺伝子のプロモーター、19Kポリペプチドをコードするワクチニアウイルス遺伝子のプロモーター、42Kポリペプチドをコードするワクチニアウイルス遺伝子のプロモーター、チミジンキナーゼをコードするワクチニアウイルス遺伝子のプロモーター、28Kポリペプチドをコードするワクチニアウイルス遺伝子のプロモーターなどが例示される。

第一の組み換えベクターの作製については常法に従えば良く、例えばワクチニアウイルスの増殖に非必須なDNA断片を適当なベクターに組み込んだ後、必要に応じて該断片中に存在する制限酵素切断点を利用しその下流に制限酵素切断配列を付加したプロモーターを組み込めば良い。用いられるベクターの具体例として、例えば pBR32

2, pBR325, pBR327, pBR328, pUC7, pUC8, pUC9, pUC19などのごときプラスミド、スファージ、M13ファージなどのごときファージ、pHC79 (ジーン、11, 291, 1980年) などのごときコスミドが例示される。

本発明においては、次いで、第一の組み換えベクターのプロモーターの下流に牛バラインフルエンザⅢ型ウイルスのヘマグルチニン・ノイラミニダーゼをコードする領域を挿入して第二の組み換えベクターが作製される。挿入方法もまた常法に従えば良く、例えば第1のベクターのプロモーターの下流に予め設けられた制限酵素切断点を利用して牛バラインフルエンザⅢ型ウイルス由来のcDNA断片を挿入すれば良い。

これら第一及び第二の組み換えベクターの構築に当たっては遺伝子操作の容易な大腸菌の系を用いれば良く、使用するプラスミドベクターも目的に相応しいものである限り特に限定されるものではない。

本発明においては、次に、予めワクチニアウイルスを感染させた動物培養細胞に第二の組み換えベクターを移入し、ベクターDNAとウイルスゲノムDNAの間に相同組み換えを起こさせ、組み換えワクチニアウイルスを構築する。ここで用いられる動物培養細胞はワクチニアウイルスが増殖可能なものであればよく、その具体例として、例えばTK-143 (ヒト骨肉腫由来)、FL (ヒト羊膜由来)、Hela (ヒト子宮頸部癌由来)、KB (ヒト鼻咽癌由来)、CV-1 (サル腎由来)、BSC-1 (サル腎由来)、RK13 (ウサギ腎由来)、L929 (マウス結合組織由来)、CE (鶏胚) 細胞、CEF (鶏胎児繊維芽細胞) などが例示される。

組み換えワクチニアウイルスの構築に当たっては常法に従えば良く、例えば、DNAクローニング第2巻 (DNA cloning Volume II)、実際的なアプローチ (a practical approach) pp. 191-211、デイ、エム、グローバー (D M Glover) 編、(IRLプレス、オックスフォー

ド、ワシントン) の記述に準じてワクチニアウイルスを感染させたCV-1細胞にリン酸カルシウム共沈法により処理した第二の組み換えベクターを移入させ、得られる組み換えウイルスを含むウイルス集団をEagle MEM上に培養されたTK陰性細胞に感染させBUD存在下生育してくるブランクを選択し、組み換えウイルス候補株とすれば良い。これら候補株の中から牛バラインフルエンザⅢ型ウイルスのヘマグルチニン・ノイラミニダーゼをコードするDNA断片が組み込まれたウイルスを選択する方法については、候補株をブランク純化したのち、該DNAをプローブとするハイブリダイゼーション法を利用するか、あるいは、抗牛バラインフルエンザⅢ型ウイルス抗体を用いるイムノアッセイを利用すれば良い。

(発明の効果)

かくして本発明によれば、ワクチニアウイルスの増殖に非必須なゲノム領域に牛バラインフルエンザⅢ型ウイルス由来の抗原コードcDNAがプロモーター機能を有するDNAと共に発現可能な

形で組み込まれた、牛用生ワクチンとして利用可能な、組み換えワクチニアウイルスが得られる。

(実施例)

以下に実施例を挙げて本発明をさらに具体的に説明する。

実施例 1

(1) B P I V 3 感染細胞からの mRNA の抽出

ヒト胎児肺由来株化細胞 R 6 6 に B P I V 3 M 株を感染させ、ウイルスを増殖後、培養液を除去し、そこにアクチノマイシン D 含有 5 % T P B - M E M を加え更に培養し、培養液を除去する。こうして調製したウイルス感染細胞よりグアニジウム溶液による抽出と塩化セシウム密度勾配遠心 (細胞工学、vol. 2, No. 2, 1983) により全 RNA を分離した。

上記全 RNA を T E (トリス E D T A) 溶液としたのち、吸着パツファー (T E pH 7.5 + 0.5 M NaCl) で平衡したオリゴ d T セルロースカラムを用いて全 RNA から mRNA を分離した。

リング後 DNA リガーゼによりライゲーション反応を行ない、環状化した。その後、DNA リガーゼ、DNA ポリメラーゼ I、RNAse H を加え、RNA 鎖の DNA 鎖への置換反応を実施し、生成した組み換えプラスミドを大腸菌 H B 1 0 1 コンピテントセルに導入し、得られた形質転換菌の中から目的の H N 遺伝子を含む組み換えプラスミド (M 1 7 6) を有する形質転換菌を以下に述べる手順により選択した。

(3) B P I V 3 M 株 H N 遺伝子を含む組み換えプラスミド M 1 7 6 のスクリーニング

ウイルス学 155, 688~696 (1986) に記載の方法に従って組み換えプラスミドのスクリーニングを行なう。即ち、上述の如く調製した形質転換菌について B P I V 3 910 N 株ゲノム RNA をプローブとするコロニーハイブリダイゼーションを行ない、ポジティブな菌を選択した。それらの菌に含まれるプラスミドを S V 4 0 でトランスフォームされた C V - 1 細胞 (C O S 細胞) にリン酸カルシウム法により、ト

(2) 岡山 - バーク法による B P I V 3 M 株遺伝子を含むプラスミドの構築 (第 1 図参照)

プラスミド p c D V - 1 (ファルマシア製) を制限酵素 K p n I で消化後、ターミナルトランスフェラーゼ (T T a s e) で d T 鎖を付加し、さらに制限酵素 E c o R I で切断後、長い方の DNA 断片 (約 2.9 K b p) を分離・回収し、ベクタープライマーを得た。

一方プラスミド p L 1 (ファルマシア製) を制限酵素 P s t I で消化後、T T a s e で d G 鎖を付加し、さらに制限酵素 H i n d III で切断後、最も短い断片 (約 0.5 K b p) を分離・回収しリンカー DNA を得た。

次いで (1) で得た mRNA と、先きに調製した p c D V 1 ベクタープライマーを混合し、アニーリングしたのち、リバーストランスクリプターゼ (R T a s e) を加え c D N A 合成を実施し、更に T T a s e による d C 鎖付加反応を実施した。これを制限酵素 H i n d III で消化した。消化後、先に調製した p L 1 由来リンカー DNA を加え、アニー

ランスフエクシオンしたのち、統生化学実験講座 5 免疫生化学研究報 p 66~77 に記載の方法に従って一次抗体として H N に対する単クローン抗体 (ウイルス学 155, (p 688~696 (1986) 参照)、二次抗体としてイソチアン酸フルオレセイン抗体結合抗マウス Ig G 抗体を用いる蛍光抗体法によつてヘマグルチニン・ノイラミダーゼの発現を確認した。

(4) H N 遺伝子の塩基配列の解明

組み換えプラスミド M 1 7 6 を制限酵素 B a m H I で切断し、約 1.9 K b p の H N 遺伝子を含む DNA 断片を得た。この断片について M 1 3 フォージを用いるメツシング方法 (ジーン 19, P. 269, (1982), サイエンス 241, P. 1205 (1981)) により配列分析を行なった。

その結果、c D N A の塩基配列は第 ⑤ 図に示す通りであり、そのうち H N 遺伝子に相当する部分は第 1 から第 1716 番までであることが判明した。この塩基配列から H N のアミノ酸配列は第 ⑤

図に示すメチオニンに始まりセリンで終る572のアミノ酸からなるものであることが判明した。

(5) ワクチニアウイルスチミジンキナーゼ(TK)遺伝子を含む第1の組み換えベクター(pUHK)の作製(第2図参照)

pUC9をEcoRI及びPstIで消化後、ポリメラーゼで処理し、切断端を平滑末端したのち、連結し、EcoRI部位の欠損したpUC9を作製した。このEcoRI部位欠損pUC9をHind IIIで切断後、ワクチニアウイルスTK遺伝子を含むワクチニアウイルスWR株のHind III J断片に連結し、第1の組み換えベクターpUHKを得た。

(6) ポリリンカー及びワクチニアウイルス7.5Kプロモーターが挿入されたワクチニアウイルスTK遺伝子を含む第二の組み換えベクターpNZ68K2の作製(第3図参照)ワクチニアウイルスWR株の7.5プロモーター(モスラ、セル125, p. 805~813, 1981年)を

pUC19(ファルマシア社製)のHinc II部位に挿入したのち、Hind IIIとEcoRIで順次切断

して7.5Kプロモーターの前後にポリリンカー部位を有するDNA断片(約350bp)を得た。

このDNA断片(第3図参照)を(5)で得たプラスミドpUHKのEcoRI消化物とをポリメラーゼで処理したのち、連結し、得られた組み換えプラスミドをpNZ68K2と命名した。

(7) 7.5プロモーターの下流にBPIV3 M型のHN遺伝子を挿入した第二の組み換えプラスミド(pNZ68K2HN)の作製(第4図参照)

(3)で得たBPIV3M株のmRNA由来のHN遺伝子を有するプラスミド(M176)をBamHIで消化した後、HN遺伝子を含む約1.9Kbpの断片を分離した。次いでこの断片を(5)で作製したプラスミドpNZ68K2のBamHI消化物に連結し、得られたプラスミドをpNZ68K2HNと命名した。pNZ68K2中にBPIV3HN遺伝子が存在することはこのプラスミドで大腸菌HB101株を形質転換し、プラスミドを抽出、BamHIで消化しアガロース電気泳動で約1.9Kbpの断片が得られることにより

確認した。また、EcoRIで消化し、同様に電気泳動を実施、8.4Kbp、17Kbpの断片が得られることによりワクチニアウイルス7.5Kプロモーター遺伝子に対し正方向にHN遺伝子が挿入されていることを確認した。

(8) 組換えワクチニアウイルスの作出

25cm²のカルチャーボトルに培養されたCV-1細胞にワクチニアウイルスWR株(0.1pfu/細胞)を接種し、45分後、前記の組換えプラスミドpNZ68K2HN12μgを2.2mlの滅菌水で溶かし、髄高ら(白質、核酸、酵素、27,340,1985)の方法によつてDNA-リン酸カルシウム共沈物をつくり、その0.5mlを感染CV-1細胞上に滴下した。30分間37℃、5%CO₂インキュベーターに静置し、5%牛胎児血清を含むEagle MEM 4.5mlを加えた。その3時間後培養液を交換し、48時間後、培養細胞ごと3度凍結融解し、超音波処理(30秒)した。

組換え体のHN遺伝子挿入を確認するため、6

cmのベトリ皿に培養されたTK陰性(TK⁻)143細胞に上記ブランク形成ウイルスを接種し、45分後、1%寒天、12%牛胎児血清、25μg/ml BUdR 加 Eagle MEMを接種し、3日間培養後感染細胞を0.01%中性紅で染色した。形成されたブランクをパスツールピペットで単離しEagle MEM中に希釈する。単離したブランクにつき、再度同様の操作を繰り返しブランクを純化した。純化したブランクより得られたウイルスを増殖させ、増殖ウイルスよりDNAを調製し、ヘマグルチニン・ノイラミニダーゼをコードするcDNAをプローブとするドットブロットハイブリダイゼーションにより、得られた組み換えワクチニアウイルスが牛バラインフルンザ3型ウイルスM株由来のヘマグルチニン・ノイラミニダーゼをコードするDNAをゲノム内に持つ組み換えウイルスであることを確認した。

(9) 組換え体の細胞での発現

組換え培養用チャンバースライドに培養したCV-1細胞に、0.01又は0.1の本発明

ウイルス株(アHNWR)を接種し、37℃、1時間感染後ウイルス液を抜きとり、細胞をEagle MEMで洗浄し、5%牛胎児血清、40μg/ml シトシンアラビノシド加Eagle MEMを加えた。16時間後、Eagle MEMを除き、軽くPBS(リン酸緩衝生理食塩水)で洗い、軽く風乾した後、-20℃アセトン:エタノール(1:1)中5分間処理し細胞を固定する。一次抗体として抗牛バラインフルエンザ3型ウイルス・ウサギ抗体、二次抗体としてイソチアン酸フルオレセイン結合抗ウサギIgG抗体を使用する蛍光抗体法でチェックし、組み換えワクチニアウイルスが牛バラインフルエンザ3型ウイルスのヘマグルチニン・ノイラミニダーゼ蛋白生産能を持つことを確認した。

実施例2

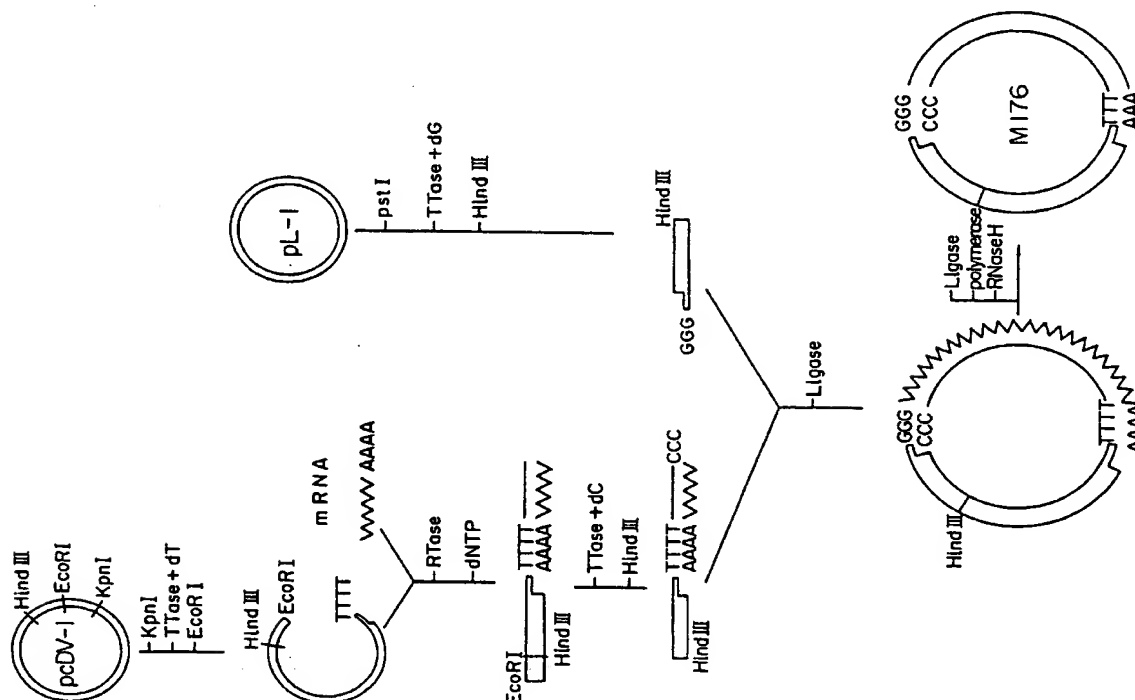
BPIV3M株のかわりにBPIV3 910N株を使うこと以外は実施例1とまったく同様な操作を実施したところ、やはり同様に牛バラインフルエンザ3型ウイルスのヘマグルチニン・ノイ

ラミニダーゼをコードするcDNAが組み込まれた組み換えワクチニアウイルスが得られた。なお、910N株由来のcDNAの塩基配列は全部で1716個の塩基配列中8個の塩基配列がM株由来のcDNAとは異なっていた。その塩基配列とアミノ酸配列は第6図に示す。

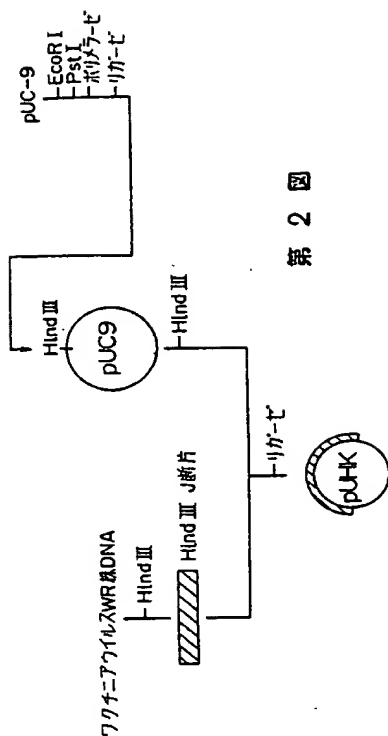
4. 図面の簡単な説明

第1図はM176、第2図はpUHK、第3図はpNZ68K2、第4図はpNZ68K2HNの構築手順を、また第5図及び第6図はそれぞれ牛バラインフルエンザ3型ウイルスM株及同910N株由来のヘマグルチニン・ノイラミニダーゼをコードするcDNAの塩基配列及びアミノ酸配列を示す。

代理人 浅 村 皓

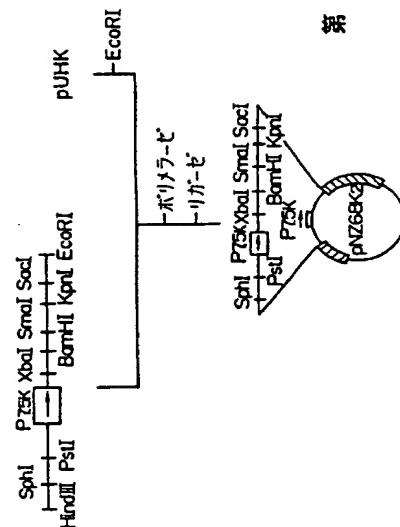


第 1 図

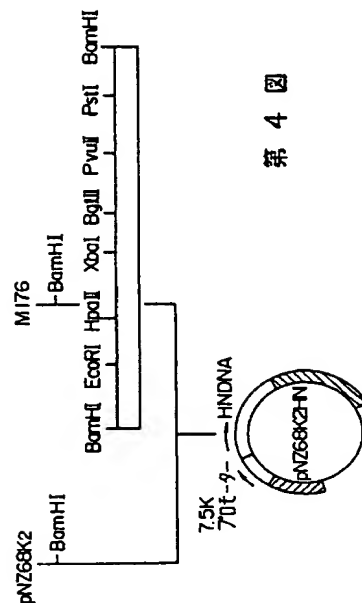


第 2 図

ポリA-シグナル75Kプロモーター遺伝子+ポリリンカー



第 3 図



第 4 図

AGGACAAAG TTGCTCAACA CAGCAACACC AGACAGACCA AAGTCAGTG CAGAGACGAC ACCAATTCA AAA

27 54
ATG GAA TAT TGG AAA CAC ACA AAC GAC GGC AAC AAT GAA CCT GGG
Met Glu Tyr Trp Lys His Thr Asn Ser Thr Lys Asp Ala Asn Asn Glu Pro Gly

81 108
ACA ACC AGA GAC AGA CAC AGC AGC AAA GCC ACA AAT ATC ACA ATG TAC ATC TTC
Thr Thr Arg Asp Arg His Ser Ser Lys Ala Thr Asn Ile Thr Met Tyr Ile Phe

135 162
TGG ACA ACA TCA ACA ATA TTA TCA GTC ATT TTT ATA ATG ATA TTG ATA AAT
Trp Thr Thr Thr Ser Thr Ile Leu Ser Val Ile Phe Ile Met Ile Leu Ile Asn

189 216
TTA ATT CAA GAG AAC AAT CAC AAC AAA TTA ATG TTG CAG GAA ATA AGG AAA GAA
Leu Ile Gln Glu Asn Asn Ile Asn Lys Leu Met Leu Gln Glu Ile Arg Lys Glu

243 270
TTC GCA GCA ATA CAT ACC AAA ATT CAA AAG ACC TCA GAT GAC ATT GGT ACC TCA
Phe Ala Ala Ile Asp Thr Lys Ile Gln Lys Thr Ser Asp Asp Ile Gly Thr Ser

297 324
ATA CAA TCA GGA ATA AAC ACA AGA CTT CTT ACA ATT CAG AGT CAT GTT CAA AAC
Ile Gln Ser Gly Ile Asn Thr Arg Leu Leu Thr Ile Gln Ser His Val Gln Asn

351 378
TAT ATT CCA TTA TCA TTA ACA CAA ATG TCA GGT CTC AGA AAA TTT ATC AAC
Tyr Ile Pro Leu Ser Leu Thr Gln Gln Met Ser Gly Leu Arg Lys Phe Ile Asn

405 432
GAT CTC ACG ACT AAA AGA GAA CAT CAA GAG GTA CCA ATA CAG AGA ATG ACT CAT
Asp Leu Thr Thr Lys Arg Glu Glu His Gln Val Pro Ile Gln Arg Met Thr His

459 486
GAT AGT GGT ATA GAA CCT CTA AAT CCG GAC AAA TTC TGG AGA TGT ACA TCT GGT
Asp Ser Gly Ile Glu Pro Leu Asn Pro Asp Lys Phe Thr Arg Cys Thr Ser Gly

513 540
AAT CCA TCT TTA ACA AGT AGT CCC AGA ATA AGA CTA ATA CCA GGC CCA GGC TTA
Asn Pro Ser Ser Leu Thr Ser Ser Pro Lys Ile Arg Leu Ile Pro Gly Pro Gly Leu

567 594
TTA GCA ACA TCC ACT ACT GTA AAT GGC TGC ATT AGA TTC CCA TCT TTA GCA ATC
Leu Ala Thr Ser Thr Thr Val Asn Gly Cys Ile Arg Phe Pro Ser Leu Ala Ile

621 648
AAT AAT CTA ATC TAC GCT TAC ACC TCT AAT CTT ATT ACC CAG GGC TGT CAA GAT
Asn Asn Leu Ile Tyr Ala Tyr Thr Ser Asn Leu Ile Thr Gln Gly Cys Gln Asp

第 5 図 (その1)

675 702
 ATA GCA AAA TCT TAC CAA GTA CTA CAA ATA GGG ATA ATT ACT ATA AAT TCA GAT
 Ile Gly Lys Ser Tyr Gln Val Leu Gln Ile Gly Ile Thr Ile Aen Ser Asp
 729 756
 TTG GTA CCT GAT TTG AAC CCA AGA GTC ACA CAT ACA TTT AAT ATT GAT GAC AAT
 Leu Val Pro Asp Leu Aen Pro Arg Val Thr His Thr Phe Aen Ile Asp Asp Aen
 783 810
 AGC AAA TCC TGC TCC CTT GCA CTA TTG AAC ACA GAT GTT TAT CAA CTA TGT TCA
 Arg Lys Ser Cys Ser Leu Ala Leu Leu Aen Thr Asp Val Tyr Gln Leu Cys Ser
 837 864
 ACC CCA AAA GTT GAT GAG AGA TCA GAT TAC GCA TCA ACA GGT ATT GAG GAC ATT
 Thr Pro Lys Val Asp Glu Arg Ser Asp Tyr Ala Ser Thr Gly Ile Glu Asp Ile
 891 918
 GTA CTT GAC ATT GTC ACT AGT AAT GGA TTA ATT ATA ACA ACA AGA TTC ACG AAT
 Val Leu Asp Ile Val Thr Ser Aen Gly Leu Ile Thr Thr Arg Phe Thr Aen
 945 972
 AAT AAT ATA ACT TTT GAT AAA CCT TAT GCA GCA TTA TAT CCA TCA GTA GCA CCA
 Aen Aen Ile Thr Phe Asp Lys Pro Tyr Ala Ala Leu Tyr Pro Ser Val Gly Pro
 999 1026
 GGA ATA TAT TAT AAA GAC AAA GTT ATC TTC CTC GCA TAT GGA GGT CTA GAG CAT
 Gly Ile Tyr Tyr Lys Asp Lys Val Ile Phe Leu Gly Tyr Gly Gly Leu Glu His
 1053 1080
 GAA GAA AAC GGG GAC GTA ATA TCC AAC ACA ACT GGT TGT CCT GGC AAA ACA CAG
 Glu Glu Aen Gly Asp Val Ile Cys Aen Thr Thr Gly Cys Pro Gly Lys Thr Gln
 1107 1134
 AGA GAC TGC AAT CAG GCC TCT TAC AGC CCA TGG TTC TCA AAT ACG AGA ATG GTA
 Arg Asp Cys Aen Gln Ala Ser Tyr Ser Pro Trp Phe Ser Aen Arg Arg Met Val
 1161 1188
 AAT TCC ATT ATC GTT GAT AAA GGT ATA GAT ACA ACC TTT ACG TTA AGA GTG
 Aen Ser Ile Ile Val Val Asp Lys Gly Ile Asp Thr Thr Phe Ser Leu Arg Val
 1215 1242
 TGG ACT ATT CCA ATG ACA CAA AAC TAT TGG GGG TCA GAA GGA AGA CTG CTT TTA
 Trp Thr Ile Pro Met Arg Gln Aen Tyr Trp Gly Ser Glu Gly Arg Leu Leu Leu
 1269 1296
 TTA GGT GAC AGA ATA TAC ATA TAT ACT ACA TCT ACG AGT TGG CAC AGT AAA TTA
 Leu Gly Asp Arg Ile Tyr Thr Thr Arg Ser Thr Ser Trp His Ser Lys Leu
 1323 1350
 CAG TTA GGG GTA ATT GAC ATT TCT GAT TAT AAT AAT ATA ACA ATA AAT TGG ACT
 Gln Leu Gly Val Ile Asp Ile Ser Asp Tyr Aen Aen Ile Arg Ile Aen Trp Thr

1377 1404
 TGG CAT AAT GTA CTA TCA CGG CCA GGG AAT GAT GAA TGT CCA TGG GGT CAT TCA
 Trp His Aen Val Leu Ser Arg Pro Gly Aen Asp Glu Cys Pro Trp Gly His Ser

1431 1458
 TGC CCA GAC GGA TGC ATA ACA GGA GTT TAC ACT GAT GCA TAT CCA CTA AAC CCA
 Cys Pro Asp Gly Cys Ile Thr Gly Val Tyr Thr Asp Ala Tyr Pro Leu Aen Pro

1485 1512
 TCA GGG AGT ATT GTA TCC TCA GTC ATT CTT GAT TCA CAA AAA TCC AGA GAA AAC
 Ser Gly Ser Ile Val Ser Ser Val Ile Leu Asp Ser Gln Lys Ser Arg Glu Aen

1539 1566
 CCA ATC ATT ACC TAT TCA ACA GCT ACA AAT AGG GTA AAT GAA TGG GCT ATA TAC
 Pro Ile Ile Thr Tyr Ser Thr Ala Thr Aen Arg Val Aen Glu Trp Ala Ile Tyr

1593 1620
 AAC AGA ACA CTT CCA GCT GCA TAC ACA ACA AAT TGT ATC ACA CAC TAT GAT
 Aen Arg Thr Leu Pro Ala Ala Tyr Thr Thr Thr Aen Cys Ile Thr His Tyr Asp

1647 1674
 AAA GGG TAT TGT TTT CAT ATA GTA GAA ATA AAT CAC AGA AGT TTG AAC ACG TTT
 Lys Gly Tyr Cys Phe His Ile Val Glu Ile Aen His Arg Ser Leu Aen Thr Phe

1701
 CAA CCT ATG TTA TTT AAA ACA GAA GTT CCG AAA AAC TGC AGC TAAACTGATC
 Gln Pro Met Leu Phe Lys Thr Glu Val Pro Lys Aen Cys Ser

CCCGCACACT GAACATTAGA TGACACACAT AGAAACCACC AAACAGACAA CACAGGAGAT
 AATGCAAGAC ACAAAGAAAT TACAAAAAA

ATA GGA AAA TCT TAC CAA GTA CTA ATA GGG ATA ATT ACT ATA AAT TCA GAT lle Gly Lys Ser Tyr Gln Val Leu Gln lle Gly lle Thr lle Aen Ser Asp	675	702	AGGACAAAG TTGCTCAACA CAGCAACACC AGACAGACCA AAGTCAGTG CAGAGACGAC ACCAAATTCA AAA
TTG GTA CCT GAT TTG AAC CCA AGA GTC ACA CAT ACA TTT AAT ATT GAT GAC AAT Leu Val Pro Asp Leu Aen Pro Arg Val Thr His Thr Phe Aen lle Asp Asp Aen	729	756	ATG GAA TAT TGG AAA CAC ACA AAC AGC ACA AAG GAC ACT AAC AAT GAA CTT GGG Met Glu Tyr Trp Lys His Thr Aen Ser Thr Lys Asp Thr Aen Aen Glu Leu Gly
AGG AAA TCC TGC TCC CTT GCA CTA TTG AAC ACA GAT GTT TAT CAA CTA TGT TCA Arg Lys Ser Cys Ser Leu Ala Leu Leu Aen Thr Asp Val Tyr Gln Leu Cys Ser	783	810	ACA ACC AGA GAC ACA CAC AGC AGC AAA GCC ACA AAT ATC ATA ATG TAC ATC TTC Thr Thr Arg Asp Arg His Ser Ser Lys Ala Thr Aen lle lle Met Tyr lle Phe
ACC CCA AAA GTT GAT GAG AGA TCA GAT TAC CCA TCA ACA GGT ATT GAG GAC ATT Thr Pro Lys Val Asp Glu Arg Ser Asp Tyr Ala Ser Thr Gly lle Gly Asp lle	837	864	TGG ACA ACA ACA TCA ACA ATA TTA TCA GTC ATT TTT ATA ATG ATA TTG ATA AAT Tyr Thr Thr Thr Thr Ser Thr lle Leu Ser Val lle Phe lle Met lle Leu lle Aen
GTA CTT GAC ATT GTC ACT AGT AAT GGA TTA ATT ATA ACA ACA AGA TTC ACG AAT Val Leu Asp lle Val Thr Ser Aen Gly Leu lle Thr Thr Arg Phe Thr Aen	891	918	TTA ATT CAA GAG AAC AAT CAC AAC AAA TTA ATG TTG CAG GAA ATA AGG AAA GAA Leu lle Gln Glu Aen Aen His Aen Lys Leu Met Leu Gln Glu lle Arg Lys Glu
AAT AAT ATA ACT TTT GAT AAA CCT TAT GCA GCA TTA TAT CCA TCA GTA GGA CCA Aen Aen lle Thr Phe Asp Lys Pro Tyr Ala Ala Leu Tyr Pro Ser Val Gly Pro	945	972	TTC GCA GCA ATA GAT ACC AAA ATT CAA AAG ACC TCA GAT GAC ATT GGT ACC TCA Phe Ala Ala lle Asp Thr Lys lle Gln Lys Thr Ser Asp Asp lle Gly Thr Ser
GGA ATA TAT TAT AAA GAC AAA GTT ATC TTC CTC GGA TAT GGA GGT CTA GAG CAT Gly lle Tyr Tyr Lys Asp Lys Val lle Phe Leu Gly Tyr Gly Gly Leu Glu His	999	1026	ATA CAA TCA GGA ATA AAC ACA AGA CTT CTT ACA ATT CAG AGT CAT GTT CAA AAC lle Gln Ser Gly lle Aen Thr Arg Leu Leu Thr Thr lle Gln Ser His Val Gln Aen
GAA GAA AAC GGG GAC GTA ATA TGC AAC ACA ACT GGT TGT CCT GGC AAA ACA CAG Glu Glu Aen Gly Asp Val lle Cys Aen Thr Thr Gly Cys Pro Gly Lys Thr Gln	1053	1080	TAT ATT CCA TTA TCA TTA ACA CAA CAA ATG TCA GAT CTC AGA AAA TTT ATC AAC Tyr lle Pro Leu Ser Leu Thr Gln Gln Thr Arg Leu Leu Thr Thr Ser Asp Leu Arg Lys Phe lle Aen
AGA GAC TGC AAT CAG GCC TCT TAC AGC CCA TGG TTC TCA AAT AGG AGA ATG GTA Arg Asp Cys Aen Gln Ala Ser Tyr Ser Pro Trp Phe Ser Aen Arg Arg Met Val	1107	1134	GAT CTC ACG ACT AAA AGA GAA CAT CAA GAG GTA CCA ATA CAG AGA ATG ACT CAT Asp Leu Thr Thr Lys Arg Glu His Glu Glu Val Pro lle Gln Arg Met Thr His
AAT TCC ATT ATC GTT GAT AAA GGT ATA GAT ACA ACC TTT AGC TTA AGA GTG Aen Ser lle lle Val Val Asp Lys Gly lle Asp Thr Thr Phe Ser Leu Arg Val	1161	1188	GAT AGT GGT ATA GAA CCT CTA AAT CCG GAC AAA TTC TGG AGA TGT ACA TCT GGT Asp Ser Gly lle Gly Pro Leu Aen Pro Asp Lys Phe Thr Trp Arg Cys Thr Ser Gly
TGG ACT ATT CCA ATG AGA CAA AAC TAT TGG GGG TCA GAA GGA AGA CTG CTT TTA Trp Thr lle Pro Met Arg Gln Aen Tyr Trp Gly Ser Glu Gly Arg Leu Leu Leu	1215	1242	AAT CCA TCT TTA ACA AGT AGT CCC AAG ATA AGA CTA ATA CCA GGG CCA GGT TTA Aen Pro Ser Ser Leu Thr Ser Ser Pro Lys lle Arg Leu lle Pro Gly Pro Gly Leu
TTA GGT GAC AGA ATA TAC ATA TAT ACT AGA TCT ACG AGT TGG CAC AGT AAA TTA Leu Gly Asp Arg lle Tyr lle Tyr Thr Arg Ser Thr Ser Trp His Ser Lys Leu	1269	1296	TTA GCA ACA TCC ACT ACT GTA AAT GGC TGC ATT AGA CTC CCA TCT TTA GCA ATC Leu Ala Thr Ser Thr Thr Val Aen Gly Cys lle Arg Leu Pro Ser Leu Ala lle
CAG TTA GGG GTA ATT GAC ATT TCT GAT TTT AAT AAT ATA AGA ATA AAT TCG ACT Gln Leu Gly Val lle Asp lle Ser Asp Phe Aen Aen lle Arg lle Aen Trp Thr	1323	1350	AAT AAT CTA ATC TAC GGT TAC ACC TCT AAT CTT ATT ACC CAG GGC TGT CAA GAT Aen Aen Leu lle Tyr Ala Tyr Thr Ser Aen Leu lle Thr Gln Gly Cys Gln Asp

第 6 図 (その1)

第 6 図 (その2)

1377 1404
TGG CAT AAT GTA CTA TCA CGG CCA GGG AAT GAT GAA TGT CCA TGG GGT CAT TCA
Trp His Asn Val Leu Ser Arg Pro Gly Asn Asp Glu Cys Pro Trp Gly His Ser

1431 1458
TGC CCA GAC GGA TGC ATA ACA GGA GTT TAC ACT GAT GCA TAT CCA CTA AAC CCA
Cys Pro Asp Gly Cys Ile Thr Gly Val Tyr Thr Asp Ala Tyr Pro Leu Asn Pro

1485 1512
TCA GGG AGT ATT GTA TCC TCA GTC ATT CTT GAT TCA CAA AAA TCC AGA GAA AAC
Ser Gly Ser Ile Val Ser Ser Val Ile Leu Asp Ser Gln Lys Ser Arg Glu Asn

1539 1566
CCA ATC ATT ACC TAT TCA ACA GCT ACA AAT AGG GTA AAT GAA TGG GCT ATA TAC
Pro Ile Ile Thr Tyr Ser Thr Ala Thr Asn Arg Val Asn Glu Trp Ala Ile Tyr

1593 1620
AAC AGA ACA CTT CCA GCT GCA TAC ACA ACA ACA AAT TGT ATC ACA CAC TAT GAT
Asn Arg Thr Leu Pro Ala Ala Tyr Thr Thr Thr Asn Cys Ile Thr His Tyr Asp

1647 1674
AAA GGG TAT TGT TTT CAT ATA GTA GAA ATA AAT CAC AGA AGT TTG AAC ACG TTT
Lys Gly Tyr Cys Phe His Ile Val Glu Ile Asn His Arg Ser Leu Asn Thr Phe

1701
CAA CCT ATG TTA TTT AAA ACA GAA GTT CCG AAA AAC TGC AGC TAAACTGATC
Gln Pro Met Leu Phe Lys Thr Glu Val Pro Lys Asn Cys Ser

CCCGCACACT GAACATTAGA TGACACACAT AGAAACCACC AAACAGACAA CACAGGAGAT

AATGCAAGAC ACAAAGAAAT TACAAAAAA

第 6 図 (その 3)